FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Calretinin
Clon DAK-Calret 1
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Nº de catálogo IS627

Uso previsto

Para uso en diagnóstico *in vitro*.

Se prevé el uso de FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Calretinin, Clon DAK-Calret 1, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) en inmunohistoquímica junto con los instrumentos Dako Autostainer/Autostainer Plus. Este anticuerpo marca calretinina en células mesoteliales normales y neoplásicas, y representa una herramienta útil en la identificación de mesoteliomas malignos de tipo epitelial y para diferenciar estas neoplasias malignas de metástasis de adenocarcinoma de pulmón (1–3). Los anticuerpos contra calretinina pueden resultar útiles en el diagnóstico diferencial de tumores estromales de los cordones sexuales de los ovarios, tales como tumores de células granulosas (4). La interpretación clínica de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse con estudios morfológicos con controles adecuados y debe evaluarla un patólogo calificado dentro del contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Resumen y explicación

La calretinina se identificó por primera vez mediante clonación de ADNc de retina de pollo, y es miembro de la superfamilia de proteínas transportadoras de calcio (CaBP), a la que también pertenecen la calbindina, la parvalbúmina y la calmodulina. Esta familia se caracteriza por una secuencia de aminoácidos que se pliega en una estructura hélice-bucle-hélice que constituye el dominio de unión al calcio (motivos EF-hand) (5). En humanos, la masa molecular de la calretinina es 32 kDa y la proteína contiene cinco sitios de unión al Ca^{2+} (6). La calretinina se expresa abundantemente en tejidos neurales centrales y periféricos, particularmente en la retina y en las neuronas de las vías sensoriales (6) y se ha planteado que, debido a sus capacidades amortiguadoras, podría cumplir una función importante en la supervivencia de las células nerviosas durante las alteraciones en la homeostasis del calcio (7). El hallazgo de calretinina en células productoras de andrógeno ha llevado a sugerir que la expresión de la proteína puede estar relacionada con la secreción de esteroides (8).

Consulte las *Instrucciones generales para la tinción inmunohistoquímica* de Dako o las instrucciones del sistema de detección de los procedimientos de IHQ para: 1) Principio del procedimiento, 2) Material necesario pero no suministrado, 3) Almacenamiento, 4) Preparación de la muestra, 5) Procedimiento de tinción, 6) Control de calidad, 7) Solución de problemas, 8) Interpretación de la tinción, 9) Limitaciones generales.

Reactivo suministrado

Anticuerpo monoclonal de ratón listo para usar, suministrado en forma líquida en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida de sodio.

Clon: DAK-Calret 1. Isotipo: IgG1, kappa.

Inmunógeno

A partir de la línea de células de mesotelioma maligno humano, Mero-41 (9, 10), el gen que codifica la calretinina se amplificó por PCR y se expresó como proteína recombinante en *E. coli*. La proteína purificada se utilizó para la inmunización.

Especificidad

En inmunohistoquímica, el anticuerpo marca específicamente la calretinina.

Precauciones

1. Para usuarios profesionales.
2. Este producto contiene azida de sodio (NaN_3), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. Aunque a las concentraciones presentes en el producto no está clasificada como peligrosa, la azida de sodio puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre formando acumulaciones de azidas metálicas altamente explosivas. Una vez desechado el producto, deje correr abundante cantidad de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.
3. Al igual que con cualquier producto de origen biológico, deberán aplicarse los procedimientos de manipulación adecuados.
4. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel.
5. La solución que no se utilice deberá desecharse de acuerdo con las normativas locales, provinciales y nacionales.

Almacenamiento

Almacenar a 2–8 ℃. No utilizar después de la fecha de caducidad impresa en el vial. Si los reactivos se almacenan en condiciones diferentes a las especificadas, el usuario deberá comprobar dichas condiciones. No existen signos evidentes que indiquen inestabilidad de este producto. Por lo tanto, los controles positivo y negativo deberán analizarse de manera simultánea con las muestras de pacientes. En caso de observarse una coloración inesperada que no puede ser explicada por las variaciones en los procedimientos del laboratorio y sospeche un problema con un anticuerpo, comuníquese con la asistencia técnica de Dako.

Preparación de las muestras, incluido material necesario pero no suministrado

El anticuerpo puede utilizarse para marcar cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. Las muestras de tejido deben cortarse en secciones de aproximadamente 4 µm.

Se requiere el tratamiento previo con recuperación del epítopo inducida por calor (HIER) usando Dako PT Link (nº de catálogo PT100/PT101). Para más detalles, consulte la Guía del usuario de PT Link. Se obtienen resultados óptimos al pretratar los tejidos con EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (nº de catálogo K8010/K8004).

Cortes incluidos en parafina: se recomienda el tratamiento previo de los cortes de tejido fijados en formol e incluidos en parafina siguiendo el procedimiento de preparación de la muestra 3 en 1 para Dako PT Link. Siga el procedimiento previo al tratamiento explicado en el prospecto de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

pH (50x) (nº de catálogo K8010/K8004). Nota: Después de la tinción, se deben deshidratar, enjuagar y montar los cortes usando un medio de montaje permanente.

Cortes desparafinados: se recomienda el tratamiento previo de los cortes de tejido desparafinados, fijados en formol e incluidos en parafina usando Dako PT Link y siguiendo el mismo procedimiento descrito para los cortes incluidos en parafina. Tras la tinción, los portaobjetos deben montarse utilizando un medio de montaje acuoso o permanente.

Los cortes de tejido no se deben secar durante el tratamiento ni durante el siguiente procedimiento de tinción inmunohistoquímica. Para una mejor adherencia de los cortes de tejidos a los portaobjetos, se recomienda el uso de FLEX IHC Microscope Slides (nº de catálogo K8020).

Procedimiento de tinción, incluido material necesario pero no suministrado

El sistema de visualización recomendado es EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (nº de catálogo K8010). Los pasos de tinción y los tiempos de incubación han sido preprogramados en el software de los instrumentos Dako Autostainer/Autostainer Plus, utilizando los siguientes protocolos:

Plantilla del protocolo: FLEXRTU2 (volumen de aplicación 200 µL) o FLEXRTU3 (volumen de aplicación 300 µL)
Autoprogram: Calret (sin contratinción) o CalretH (con contratinción)

El paso auxiliar debe configurarse a “tampón de enjuague” en sesiones de tinción con ≤10 portaobjetos. En el caso de sesiones de tinción con >10 portaobjetos, el paso auxiliar debe configurarse a “ninguno”. De esta manera se aseguran tiempos de lavado semejantes.

Todos los pasos de incubación deben realizarse a temperatura ambiente. Consulte el Manual del usuario para más detalles sobre el instrumento correspondiente. Si todavía no están disponibles los protocolos en el instrumento Dako Autostainer utilizado, comuníquese con el servicio técnico de Dako.

Las condiciones óptimas pueden variar según la muestra y el método de preparación, y deberán determinarse individualmente en cada laboratorio. Si el patólogo encargado de la evaluación desea otra intensidad de tinción, se puede solicitar información a un especialista en aplicaciones de Dako o a un especialista del servicio técnico para reprogramar el protocolo. Verifique que el rendimiento del protocolo ajustado siga siendo válido confirmando que el patrón de tinción sea idéntico al descrito en “Características de resultados”.

Se recomienda la contratinción con hematoxilina usando EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (nº de catálogo K8018). Se recomienda un medio de montaje no acuoso permanente.

Los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea empleando el mismo protocolo que para las muestras del paciente. El control positivo de tejido debe incluir colon, y las células/estructuras deben exhibir patrones de reacción como se describe para este tejido en “Características de resultados” en todas las muestras positivas. El reactivo de control negativo recomendado es FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (nº de catálogo IS750).

Interpretación de la tinción

Las células marcadas por el anticuerpo muestran tinción citoplasmática y nuclear.

Características de resultados

Tejidos normales: El anticuerpo marca células mesoteliales normales, células nerviosas y células reticulares del colon. De los otros tejidos normales analizados, no se observó tinción en epitelio escamoso simple, riñón, hígado, páncreas, próstata y amígdala. En el colon, las células ganglionares de los nervios periféricos muestran una reacción de tinción de moderada a fuerte, mientras que los axones de los nervios periféricos muestran una reacción de leve a moderada.

Tejidos anormales: El anticuerpo marcó mesotelioma, mientras que el adenocarcinoma de pulmón, el melanoma y el carcinoma de mama y de timo fueron negativos. Las pruebas realizadas con el anticuerpo sobre tumores de células granulosas mostraron una reacción positiva.

Referencias bibliográficas

1. Barberis MCP, Faleri M, Veronese S, Casadio C, Viale G. Calretinin. A selective marker of normal and neoplastic mesothelial cells in serous effusions. Acta Cytol 1997;41:1757–61.
2. Gotzos V, Vogt P, Celio MR. The calcium binding protein calretinin is a selective marker for malignant pleural mesotheliomas of the epithelial type. Path Res Pract. 1996;192:137–47.
3. Cury PM, Butcher DN, Fisher C, Corrin B, Nicholson AG. Value of the mesothelium-associated antibodies thrombomodulin, cytokeratin 5/6, calretinin, and CD44H in distinguishing epithelioid pleural mesothelioma from adenocarcinoma metastatic to the pleura. Mod Pathol 2000;13:107–12.
4. McCluggage WG, Young RH. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in the evaluation of ovarian tumors. Semin Diagn Pathol 2005:22:3-32.
5. Rogers JH. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. J Cell Biol 1987;105:1343–53.
6. Pochet R, Blachier F, Malaisse W, Parmentier M, Pasteels B, Pohl V, et al. Calbindin-D28 in mammalian brain, retina, and endocrine pancreas: immunohistochemical comparison with calretinin. Adv Exp Med Biol 1989;255:435–43.
7. Lukas W, Jones KA. Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and exitotoxicity in vitro. Neuroscience 1994;61:307–16.
8. Bertschy S, Genton CY, Gotzos V. Selective immunocytochemical localisation of calretinin in the human ovary. Histochem Cell Biol 1998;109:59–66.
9. Versnel MA, Bouts MJ, Hoogsteden HC, van der Kwast TH, Delahaye M, Hagemeijer A. Establishment of human malignant mesothelioma cell lines. Int J Cancer 1989;44:256–60.
10. Versnel MA, Hoogsteden HC, Hagemeijer A, Bouts MJ, van der Kwast TH, Delahaye M, et al. Characterization of three human malignant mesothelioma cell lines. Cancer Genet Cytogenet 1989;42:115–28.

Explicación de los símbolos

REF	Referencia	2 °C – 8 °C	Limitación de temperatura		Fecha de caducidad
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*	Σ	Contiene suficiente para <n> ensayos		Fabricante
	Consulte las instrucciones de uso	LOT	Código del lote		

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17